

Generierung und Charakterisierung von Partikelatmosphären im ExpoLab für Inhalationsstudien am Menschen

C. Monsé, C. Möhlmann, B. Gasse, D. Kaiser, J. Bünger, T. Brüning, M. Mattenklott

ZUSAMMENFASSUNG Ziel dieses Projektes war es, verschiedene Aerosole im Expositionslabor des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA) mit einem geeigneten Probenahmesystem direkt auf einen Probenträger abzuscheiden. Mittels Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen sollte analysiert werden, welche morphologische Beschaffenheit ein Aerosol hat, unmittelbar bevor Probanden einer toxikologischen Studie luftgetragene Partikel in verschiedenen Größen inhalieren. Dabei sollten die experimentellen Umgebungsbedingungen identisch mit den Zielbedingungen des beabsichtigten bzw. bereits durchgeführten Studiendesigns sein. Zusätzlich sollte die Frage beantwortet werden, welches Partikelgeneratorsystem für zukünftige Inhalationsstudien im Expositionslabor für eine gewünschte Substanz zur Anwendung kommen kann. Die Untersuchungen umfassten nano-Zinkoxid, mikro-Zinkoxid, mikro-Bariumsulfat und zwei unterschiedliche nano-Titanoxid-Atmosphären. Begleitende Messungen bestätigten, dass es kaum Unterschiede zwischen Soll- und Zielkonzentrationen gab. Auch die zu erwartenden Partikelgrößenverteilungen wurden erreicht – mit Ausnahme eines der beiden Titanoxid-Materialien. Zusätzlich konnte die Frage beantwortet werden, ob es mit einem Suspensionsvernebler-System möglich ist, nanofine Materialien in die Atmosphärenluft unter Erhalt der ursprünglichen Partikelgröße zu resuspendieren. Allerdings funktionierte diese Methode nicht.

1 Einleitung

Expositionen gegenüber luftgetragenen Partikeln haben als Gesundheitsrisiken an vielen Arbeitsplätzen aktuell immer noch einen hohen Stellenwert. Ergebnisse aus Tierversuchen werden nach wie vor zur Ableitung von Grenzwerten und Schutzmaßnahmen am Arbeitsplatz herangezogen, beinhalten jedoch hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen große Unsicherheiten und Risiken. Im Expositionslabor (ExpoLab) des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA) werden daher seit zwölf Jahren an freiwilligen Probanden experimentelle Humanstudien zur Ableitung von Grenzwerten durchgeführt. Eine kontrollierte Inhalationsstudie mit nanoskaligem Zinkoxid (ZnO) in Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 2,0 g/m³ und zusätzlicher Nullluftkontrolle zeigte konzentrationsabhängige, systemische Entzündungseffekte. Darunter war eine Erhöhung der Körpertemperatur bei mehreren Probanden sowie eine Erhöhung von neutrophilen Granulozyten und Akutphase-Protein-Spiegeln [1]. Lokale Effekte in den Lun-

Generation and characterization of particle atmospheres in the ExpoLab for inhalation studies with humans

ABSTRACT The aim of this project was to deposit various aerosols in the exposure laboratory of the Institute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance (IPA) directly onto a sample carrier using a suitable sampling system. Scanning electron microscopy images were used to analyze the morphological nature of an aerosol immediately prior to inhalation by subjects of airborne particles of various sizes in toxicological studies. Here, the experimental environmental conditions should be identical to the target conditions of the intended or already conducted study design. In addition, the question should be answered which particle generator system can be applied for future inhalation studies in the exposure laboratory for a desired substance. The investigation included nano-zinc oxide, micro-zinc oxide, micro-barium sulfate, and two different nano-titanium dioxide atmospheres. Accompanying measurements confirmed that there were hardly any differences between target and actual concentrations and that the expected particle size distributions were also achieved, with the exception of one of the two titanium dioxide materials. In addition, the question of whether it is possible to resuspend nanofine materials into the atmospheric air while maintaining the original particle size could be answered using a suspension nebulizer system, but this method did not work.

genwegen waren auch im induzierten Sputum nachweisbar, jedoch ohne konzentrationsabhängige Beziehung [2].

In Anlehnung an die erste ZnO-Studie wurden Probanden in einer weiteren Studie 2 h lang mit nano- und mikroskaligem ZnO bei Konzentrationen von jeweils 2,0 mg/m³ ausgesetzt und mit einer Nullluftkontrolle verglichen [3]. Zum einen konnten wir die ZnO-Effekte bei den untersuchten Parametern aus der ersten ZnO-Studie bestätigen, zum anderen zeigen, dass die biologischen Effekte nach der Exposition mit mikroskaligen ZnO-Partikeln stärker ausgeprägt waren. Wir führen das auf die circa dreifach erhöhte Depositionseffizienz der mikroskaligen ZnO-Partikel in den Lungenkompartimenten zurück. Nach den abschließenden Untersuchungen zwei bis sechs Wochen nach der letzten Exposition waren alle akuten Effekte in beiden Studien vollständig reversibel. Außerdem unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass die beobachteten ZnO-Effekte nicht auf physikalische Partikeleffekte im Sinne einer Überlastung der Lunge zurückzuführen sind, sondern durch einen Zinkionen-spezifischen Effekt ausgelöst werden. Diese Hypothese konnte aktuell durch

eine weitere Humanstudie mit ähnlichem Studiendesign bestätigt werden. Es wurde mikroskaliges Bariumsulfat (BaSO_4) als Vertreter einer chemisch inerten Substanz ohne bekannte spezifische Toxizität verwendet. Selbst nach Inhalation einer noch höheren Konzentration von $4,0 \text{ mg/m}^3$ BaSO_4 für 2 h konnten keine Veränderungen von systemischen und lokalen Entzündungsparametern festgestellt werden [4]. Festzuhalten ist, dass diese Konzentration weit von möglichen Lungenüberladungen entfernt war und dass die Studie nur eingeschränkt auf länger dauernde Expositionen am Arbeitsplatz übertragbar ist.

Allen Studien gemeinsam ist, dass es aufgrund der gegebenen Partikelgrößen zu unterschiedlichen Abscheideeffizienzen in den einzelnen Lungenkompartimenten kommt. Dadurch bedingt kann es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Wirkungen im Sinne einer möglichen Gesundheitsgefährdung kommen. Daher ist die Charakterisierung der Partikelatmosphären im luftgetragenen Zustand besonders wichtig. Die vorliegende Arbeit erweitert das Repertoire der bereits vorhandenen Charakterisierungsmöglichkeiten der im ExpoLab durchgeführten Human- und Machbarkeitsstudien.

2 Methoden im ExpoLab

Bisher wurden zwei verschiedene Aerosolgeneratorsysteme zur Erzeugung von Partikelatmosphären im ExpoLab verwendet. Die Erzeugung von Nanopartikeln wurde mithilfe eines Brennersystems realisiert. Hier wurden z.B. wässrige Precursorlösungen aerosolisiert und anschließend in einer Knallgasflamme pyrolysiert. Bei diesem Prozess entstanden dann z.B. die gewünschten ZnO-Nanopartikel. Aber auch andere Partikel wurden im Rahmen von Machbarkeitsstudien ohne Probanden untersucht, wie Titandioxid (TiO_2), Siliziumdioxid (SiO_2), Kupfer(II)-oxid (CuO). Mikroskalige Partikel können nicht per Flammensynthese generiert werden; hier musste auf eine andere Methode ausgewichen werden. Sie konnten mithilfe eines Suspensionsverneblers durch Zerstäuben von wässrigen Suspensionen (z.B. ZnO , BaSO_4) erzeugt werden. Eine Zweistoffdüse saugte eine permanent gerührte Suspension von den gewünschten Partikeln in Wasser an und vernebelte sie. Innerhalb der Flugdauer des Aerosols durch das Klimaanlage-system trocknete es aus und gab die gewünschten Partikel im ExpoLab frei. Die Konzentrationshöhe der luftgetragenen Partikel wurde mit einer Pulsweitenmodulationssteuerung der Zweistoffdüse bzw. durch die Konzentrationshöhe der Suspension vorgenommen. Die Charakterisierung der Aerosole erfolgte bisher routinemäßig mit etablierten Verfahren wie:

- Messungen der Partikelgrößenverteilungen per Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) und Aerosol Particle Sizer (APS),
- Bestimmung der luftgetragenen Massen per Schwebstaubmessgerät (Tapered Element Oscillating Microbalance, TEOM),
- Ermittlung der chemischen Reinheit und REM-Aufnahmen der Materialien direkt aus der Verpackung oder nach Abscheidung per Thermophorese.

Theoretisch sollte der Suspensionsvernebler auch zur Erzeugung von nanoskaligen Partikelatmosphären geeignet sein, um auf dem freien Markt verfügbare, nanoskalige Produkte zu aerosolisieren. Bei Vorversuchen mit dem Suspensionsvernebler ist aufgefallen, dass wässrige Suspensionen z.B. von nanoskaligem TiO_2 nach dem Vernebeln nicht mehr nanoskalig waren. Die derart erzeugte Partikelatmosphäre konnte im ExpoLab als weißer Dunst

wahrgenommen werden. Es fand demnach eine Lichtbrechung statt, die bei nanoskaligen Partikeln eigentlich nicht hätte stattfinden dürfen.

2.1 Konkrete Fragestellungen

Ziel dieses Projektes war es, verschiedene Aerosole im ExpoLab direkt mit einem geeigneten Probenahmesystem abzuscheiden. Dabei sollten die experimentellen Umgebungsbedingungen identisch mit den Zielbedingungen des beabsichtigten bzw. bereits durchgeführten Studiendesigns sein. Die Charakterisierungen sollten zeigen, welche morphologische Beschaffenheit ein Aerosol unmittelbar vor einer Inhalation von Probanden bei toxikologischen Studien hat. Bei den Untersuchungen stand der luftgetragene Zustand eines Aerosols im Vordergrund. Zusätzlich sollte die Frage beantwortet werden, welches Partikelgeneratorsystem für zukünftige Inhalationsstudien im ExpoLab für eine gewünschte Substanz zur Anwendung kommen kann.

2.2 Methoden

Verschiedene Aerosole sollten mithilfe des Faserprobenahmesystems FAP (Modell FAP, Fa. GSA Messgerätebau), bestückt mit goldbedampften Kernporenfiltern (produktionsbedingt hatten einige Poren keine glatten Kanten, sondern zeigten eine „ausgefranste“ Struktur) aus Polycarbonat mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße (37 mm Durchmesser, Fa. Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte), direkt aus der ExpoLab-Luft gesammelt werden. Am Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) wurden diese per Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht und die Daten mit den Materialien aus den Verpackungen bzw. aus Abscheideexperimenten (Thermophorese von Nanopartikeln aus dem Brennersystem) verglichen. Analysiert wurden folgende Materialien:

- aus der ersten ZnO-Studie: nano-ZnO aus Flammensynthese (abgeschieden per Thermophorese vs. luftgetragen per Flammengenerator), Zielkonzentration: $2,0 \text{ mg/m}^3$,
- aus der zweiten ZnO-Studie: Kommerzielles mikro-ZnO (Verpackung vs. luftgetragen per Suspensionsvernebler), Zielkonzentration: $2,0 \text{ mg/m}^3$,
- aus der BaSO_4 -Studie: Medizinisches BaSO_4 (Verpackung vs. luftgetragen per Suspensionsvernebler), Zielkonzentration: $4,0 \text{ mg/m}^3$,
- aus der Machbarkeitsstudie: Kommerzielles TiO_2 , Handelsname P25 (Verpackung vs. luftgetragen per Suspensionsvernebler), keine bestimmte Zielkonzentration,
- aus der Machbarkeitsstudie: TiO_2 aus Flammensynthese (abgeschieden per Thermophorese vs. luftgetragen per Flammengenerator), keine bestimmte Zielkonzentration.

Staubsammlung:

Die Belegung der Kernporenfilter wurde bei allen Experimenten bei einem Volumenstrom von $2,0 \text{ l/min.}$ durchgeführt. Pro Material wurden fünf Filter nacheinander belegt unter Verdoppelung der Sammelzeit ($30, 60, 120, 240$ und 480 s). Mithilfe von REM-Aufnahmen konnte der Belegungsgrad verglichen und überprüft werden.

Tabelle Aerosolcharakterisierungen, Zielkonzentrationen und Sammelzeiten; GSD: Geometrische Standardabweichungen, (-): nicht bestimmbar, -: keine Angabe.

	nano-ZnO	mikro-ZnO	mikro-BaSO ₄	nano-TiO ₂	P25
SMPS in nm (GSD)	73 (1,69)	42 (-)	48 (-)	114 (1,67)	190 (2,93)
APS in µm (GSD)	-	1,45 (1,44)	2,1 (1,49)	-	0,77 (-)
TEOM in mg/m ³	2,01	2,06	4,07	3,80	2,05
Zielkonzentration in mg/m ³	2,00	2,00	4,00	-	-
optimale Sammelzeit in s	240	480	480	60	480

Nanopartikelsynthese:

Das Prinzip der Nanopartikelsynthese basierte auf der Pyrolyse von zerstäubter wässriger Zinkformiatlösung (46 g Zinkformiat Dihydrat, 3,0 ml Eisessig, aufgefüllt auf 1 000 ml Wasser) bzw. n-Butanollösung mit Titan(IV)-tetrakispropoxid (80 g, aufgefüllt auf 1 000 ml n-Butanol) mit einem Flammgenerator (Modell FG 3, Fa. MoTec Konzepte), der im Lüftungskanal der Klimaanlage des ExpoLabs installiert war. Der Wasserstofffluss betrug jeweils 10,0 l/min und der Sauerstofffluss 5,0 l/min. Der Zerstäuberdruck der Precursorlösungen war auf 0,30 bar eingestellt, bei einem Volumenstrom von 1,0 ml/min. Der Durchmesser der erzeugten Primärpartikel betrug etwa 10 nm. Diese Partikel bildeten Aggregate und Agglomerate mit einer mittleren Größe von 73 nm bei einer ZnO-Konzentration von 2,0 mg/m³ bzw. 114 nm bei einer TiO₂-Konzentration von 3,8 mg/m³.

Thermophorese:

Die Nanopartikel wurden in Vorexperimenten mithilfe einer Quarzglasröhre (Länge: 20 cm, Durchmesser 4 cm), die über dem Flammenkegel des Flammgenerators gestülpt war, zunächst an der Innenseite abgeschieden. Anschließend wurden die Partikel mit einem Spatel von der Oberfläche abgeschabt und aufgefangen.

Atmosphären mit mikroskaligen Partikeln:

Ein selbstkonstruierter Vernebler wurde in den Lüftungskanal der Klimaanlage des ExpoLabs aufgestellt, ausgestattet mit einem 7-Liter-Rührtank und einer selbstansaugenden Zwei-Stoff-Düse (Modell 970, Fa. Düsen-Schlick). Eine Suspension von 12,0 g ZnO (Zinkweiss Harzsiegel CF, Fa. Norzinco) in 5,0 l Wasser (Wasseraufbereitungssystem, Modell Milli-Q Advantage A 10, Fa. Merck) wurde mit Druckluft bei 3,0 bar vernebelt. Das ZnO wurde vor der Verwendung 5 min lang gesiebt, wobei nur die < 100 µm-Fraktion verwendet wurde (Vibrations-Siebmaschine, Modell AS 200 control, Fa. Retsch), um größere Klumpen im Rührbehälter auszuschließen. Für die BaSO₄-Atmosphäre wurden 18,0 g BaSO₄ (für medizinische Zwecke, Fa. Merck) in 5,0 l Wasser (Wasseraufbereitungssystem: s.o.) suspendiert. Als Precursor der TiO₂-Atmosphäre wurde eine Suspension von 8,5 g TiO₂ (Handelsname P25, Fa. Evonik Industries) in 5,0 l Wasser (Wasseraufbereitungssystem: s.o.) verwendet. Bei der Herstellung der BaSO₄- und P25-Suspensionen konnte auf eine vorgeschaltete Siebung verzichtet werden; die Materialien konnten ohne Bildung von größeren Klümpchen suspendiert werden. Alle Suspensionen wurden während der Dosierung gerührt (260 Umdrehungen pro Minute). Zwei Strömungsleitbleche waren im Tank in-

stalliert, um eine turbulente Strömung und damit über die Zeit eine gleichbleibende Homogenität der Suspension zu gewährleisten. Die Dosierung der Partikel wurde über eine Pulsweitenmodulation mittels einer Druckluftabschaltung der Zwei-Stoff-Düse gesteuert. Die Aerosoltröpfchen der versprühten Suspensionen trockneten während des Fluges ins ExpoLab aus und setzten die gewünschten Partikel frei.

Alle Expositionsszenarien wurden mit einer Luftwechselrate von 12/h (360 m³/h), einer Raumtemperatur von 24,3 °C (± 0,7 °C) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 48,1 % (± 4,3 %) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie:

Zur Überprüfung und zum Vergleich der Homogenität, des Belegungsgrades der Filter (luftgetragene Partikel auf goldbedampftem Kernporenfilter) und der Struktur der eingesetzten Stoffe (aus der Verpackung auf einem Kohlenstofftab präpariert) wurden der Everhard-Thornley-SE-Detektor und der In-Lens-Detektor SE eines REM (Modell Supra 40 VP, Fa. Zeiss) genutzt. In Verbindung mit der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse (EDX, Modell UltimMax 40, Fa. Oxford Instruments, verbaut am REM) konnte die (semiquantitative) chemische Zusammensetzung der auf den Filtern vorliegenden Partikeln überprüft und für alle untersuchten Materialien bestätigt werden. Parameter wie Vergrößerung/Auflösung, Arbeitsabstand, Beschleunigungsspannung, genutzte Blende und genutzter Detektor wurden der jeweiligen Fragestellung und der Beschaffenheit der Probe angepasst. Einige Bilder zeigten Aufladungseffekte, z. B. weiße Ränder an den Poren oder Partikeln. Diese Einschränkung der Bildqualität wurde aus Effizienzgründen aber hingenommen, da alle relevanten projektbezogenen Fragen beantwortet werden konnten.

Begleitende Charakterisierungen der Aerosole:

Ein Aerosol Particle Sizer (APS, Modell 3321, Fa. TSI, ausgestattet mit einem 1:20-Aerosolverdünner, Modell 3302 A, Fa. TSI) wurde für die Partikelgrößenverteilung im Mikrobereich verwendet. Ein Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS, Modell 3080, Fa. TSI, ausgestattet mit einem langen Differentialmobilitätsanalysator und einem Butanolkondensations-Partikelzähler, Modell 3776) bestimmte die Größenverteilungen der Nanopartikel im ExpoLab. Die Messungen beider Analysatoren wurden jeweils alle 5 min wiederholt. Messungen der luftgetragenen Partikelmassen wurden in 1-Minuten-Intervallen mit einem Schwebstaubmessgerät aufgezeichnet (TEOM, Modell 1400a, Fa. Rupprecht und Patashnik).

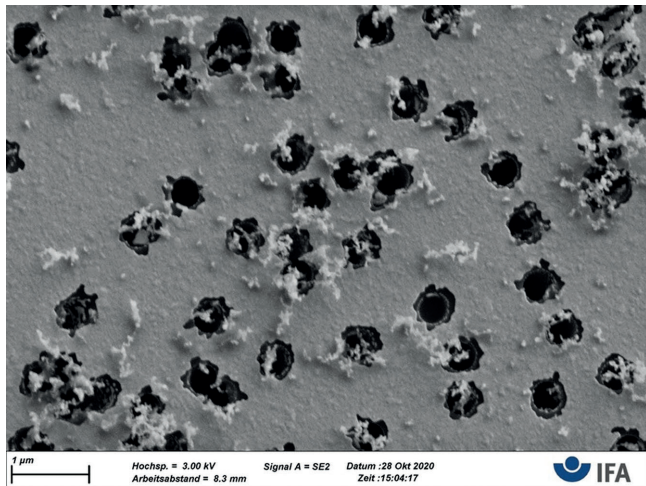


Bild 1 Luftgetragenes nano-ZnO aus dem ExpoLab, Synthese per Flammgenerator. Aufnahme: Autoren

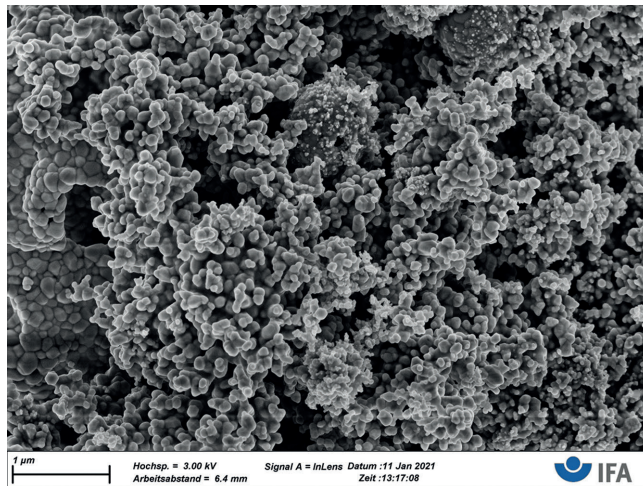


Bild 2. Nano-ZnO, gewonnen per Thermophorese. Aufnahme: Autoren

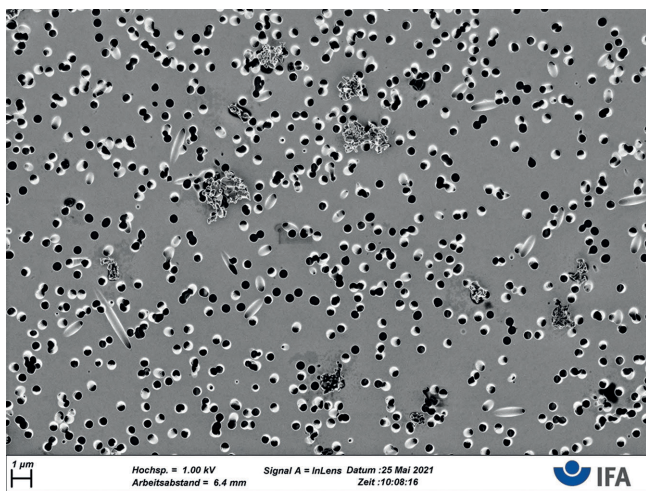


Bild 3 Luftgetragenes mikro-ZnO aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

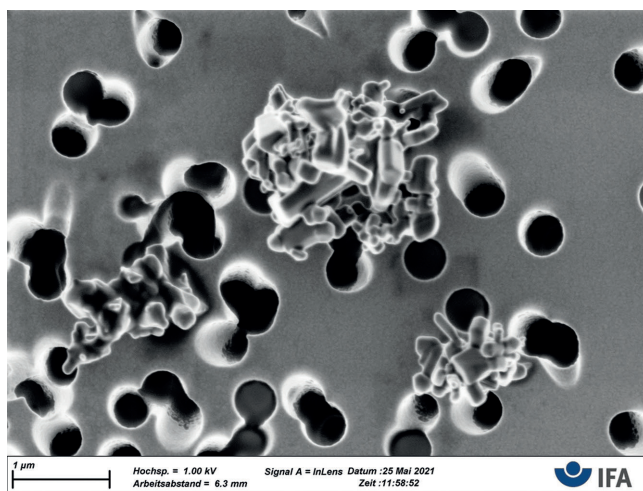


Bild 4 Detailaufnahme luftgetragenes mikro-ZnO aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

3 Ergebnisse

In der **Tabelle** sind die begleitenden SMPS-, APS- und TEOM-Messungen aufgeführt. Die SMPS- und APS-Daten spiegeln jeweils die Partikelanzahlkonzentration wider und sind als Mobilitätsdurchmesser in nm bzw. aerodynamische Durchmesser in μm angegeben. Die Werte in Klammern stellen die zu den Messkurven zugehörigen geometrischen Standardabweichungen dar. Zusätzliche Angaben wie Zielkonzentrationen und optimale Sammelzeiten sind ebenfalls angegeben.

In **Bild 1** sind Agglomerate vom nano-ZnO auszumachen, die aus ineinander verhakten Aggregaten bestehen. Die Agglomerate sehen schneeflockenartig aus und haben sich gleichmäßig über die Filteroberfläche verteilt. Eine Durchmesserangabe ist nicht zielführend, da die Agglomerate zumeist dendritische Strukturen aufweisen. Die Größe der Flocken liegt in allen sichtbaren Dimensionen aber deutlich unter $1\ \mu\text{m}$.

Das per Thermophorese abgeschiedenen nano-ZnO erscheint in **Bild 2** als kompaktes Material. Es können keine einzeln isolierte Nanopartikel auffindig gemacht werden.

Bild 3 und **Bild 4** zeigen jeweils luftgetragenes mikro-ZnO. Auffällig an diesen Aufnahmen ist, dass weder einzeln vorliegende noch in den Agglomeraten einzeln abgegrenzte Partikel zu sehen sind, sondern verschieden große Ansammlungen miteinander verklumpter Partikel. Dabei sind Ansammlungen bestehend aus wenigen 10 bis hin zu 100 verklumpter Einzelpartikeln zu sehen. Die Durchmesser der Ansammlungen bewegen sich im Bereich um $1\ \mu\text{m}$. Die mikro-ZnO-Partikel bestehen aus meistens einkristallem Material, erkennbar an den regelmäßigen Kristallformen wie hexagonalen Säulen.

Das mikro-ZnO aus der Verpackung in **Bild 5** zeigt eine unzählbar große, kompakte Ansammlung von optisch abgrenzbaren Partikeln. Hier sind Einkristalle zu erkennen, deren Größe deutlich unter $1\ \mu\text{m}$, teilweise sogar im Nanobereich (unter $100\ \text{nm}$) liegt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus **Bild 6** und **Bild 7** im Vergleich zum mikro-ZnO (Bilder 3 und 4). Es werden keine diskreten Einzelpartikel beobachtet. Bei dem Vernebelungsprozess haben sich Ansammlungen verschiedener Größen ($0,5$ bis $5\ \mu\text{m}$) gebildet, die sich in vielen Fällen im Bereich $> 2\ \mu\text{m}$ befinden. Die Auf-

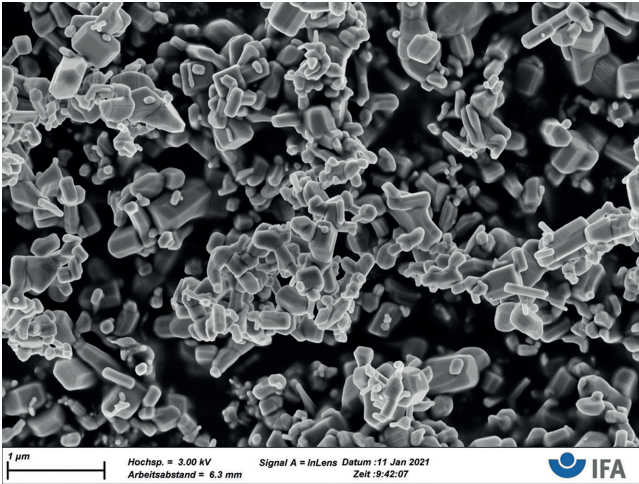


Bild 5 Mikro-ZnO aus Verpackung. Aufnahme: Autoren

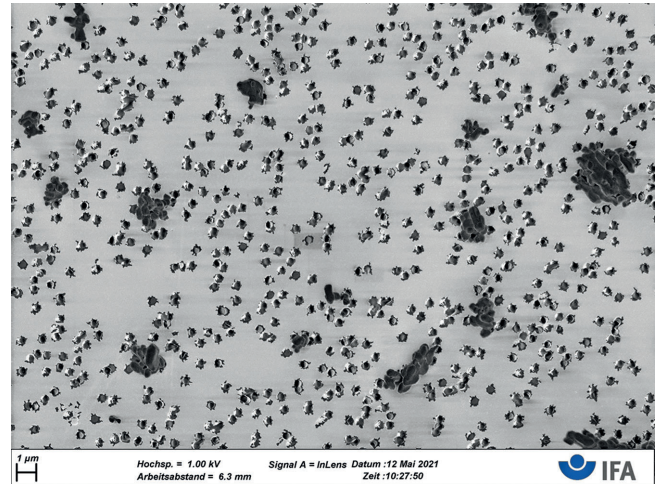


Bild 6 Luftgetragenes mikro-BaSO₄ aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

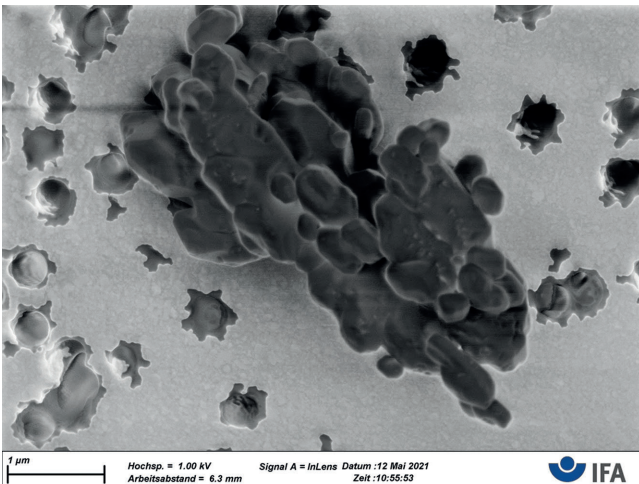


Bild 7 Detailaufnahme luftgetragenes mikro-BaSO₄ aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

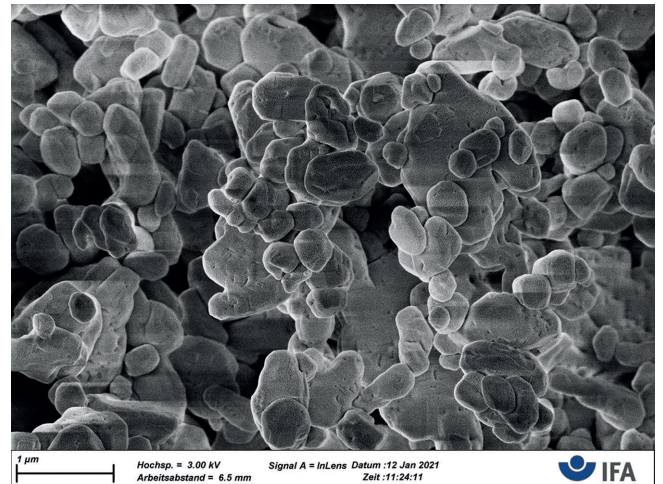


Bild 8 Mikro-BaSO₄ aus Verpackung. Aufnahme: Autoren

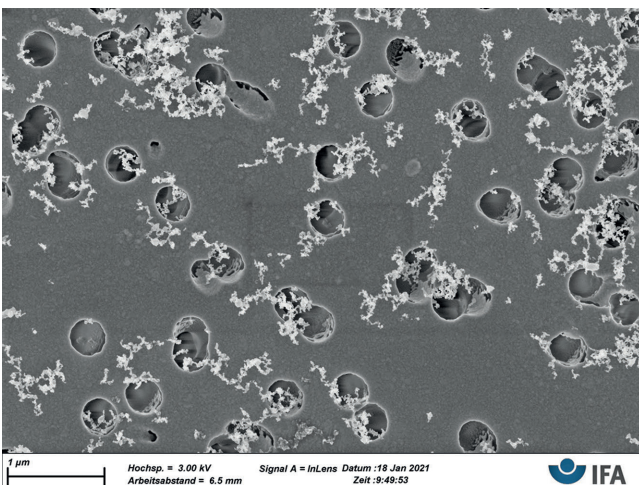


Bild 9 Luftgetragenes nano-TiO₂ aus dem ExpoLab, Synthese per Flammengenerator. Aufnahme: Autoren

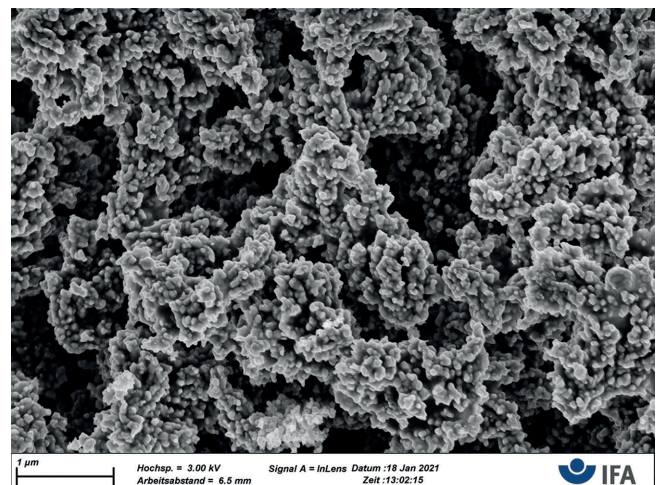


Bild 10 Nano-TiO₂, gewonnen per Thermophorese. Aufnahme: Autoren

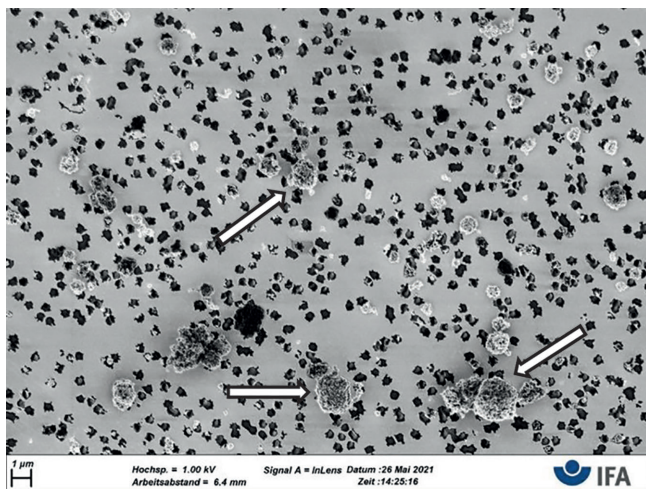


Bild 11 Luftgetragenes P25 aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

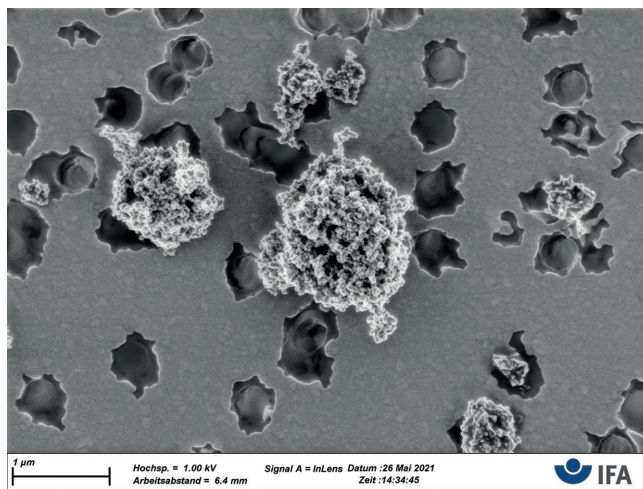


Bild 12 Detailaufnahme luftgetragenes P25 aus dem ExpoLab, Synthese per Suspensionsvernebler. Aufnahme: Autoren

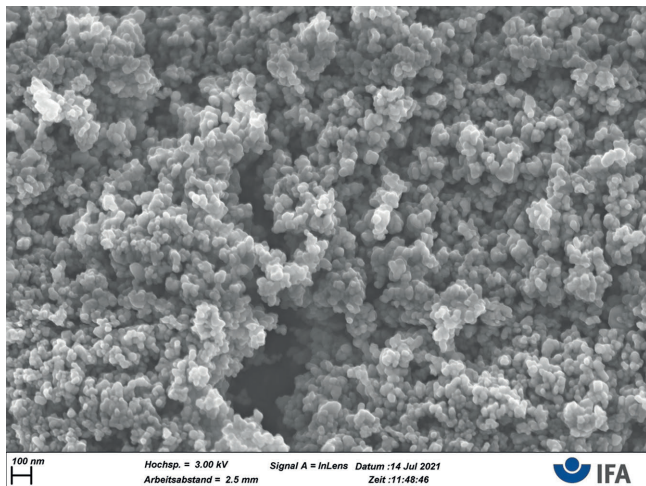


Bild 13 P25 aus Verpackung. Aufnahme: Autoren

nahme lässt vermuten, dass es sich bei den einzelnen Partikeln um Einkristalle handelt, deren Kanten abgerundet erscheinen.

Das mikro-BaSO₄ aus der Verpackung in **Bild 8** zeigt auch hier eine unzählbar große, kompakte Ansammlung einzelner Partikel, die eine Größe von ca. 200 bis 500 nm aufweisen. Gut erkennbar sind die an den Kanten abgerundeten Einkristalle.

Das nano-TiO₂ in **Bild 9** ist analog zum nano-ZnO (**Bild 1**) relativ gleichmäßig über der Filteroberfläche verteilt. Erkennbar sind Aggregate und daraus bestehende Agglomerate, die ein kettenartiges Aussehen haben. Einzelne Ketten haben eine Länge von ca. 1 µm.

Ein anderes Bild ergibt sich aus der Aufnahme des Materials, wenn es per Thermophorese gesammelt wird (**Bild 10**). Es ist nicht möglich, einzelne Nanopartikel, Aggregate oder Agglomerate zu unterscheiden. Das Material erscheint als kompakte Verklumpung von Primärteilchen, die wesentlich kleiner als 100 nm sind.

In **Bild 11** sind neben kleineren Ansammlungen von P25-Klümpchen relativ häufig wesentlich größere, kugelartige Gebilde auszumachen (s. Pfeile), die aus mehreren 1 000 Einzel-

partikeln zusammengesetzt sind, was in **Bild 12** noch deutlicher wird. Isolierte Nanopartikel von P25 können dabei nicht auszumachen. Die Durchmesser der Ansammlungen bewegen sich im Bereich von 1 bis 2 µm.

Bild 13 zeigt eine Aufnahme von P25, das direkt aus der Verpackung genommen wurde. Hier können, analog zu den anderen Materialien, keine einzelnen vorliegende Nanopartikel, Aggregate oder Agglomerate unterschieden werden. Das Material besteht aus einer Ansammlung unzähliger einzelner Partikel. Die Größe der Primärpartikel liegt weit unterhalb von 100 nm.

4 Diskussion

Bei der Synthese von Nanomaterialien per Flammgenerator werden die Partikel in situ erzeugt. Dabei entstehen beim Pyrolyseprozess zunächst Primärpartikel, die ca. 10 nm groß sind. Diese lagern sich z. B. durch Anschmelzprozesse zu kleineren Aggregaten um, die sich dann wiederum zu größeren Agglomeraten zusammenschließen. Je nach Versuchsbedingungen (Precursorkonzentration, Lüftungsrate im ExpoLab) konnten in der Folge im ExpoLab unterschiedlich große, luftgetragene Nanopartikel beobachtet und mit dem SMPS-Analysator in Hinblick auf die Partikelgrößenverteilung charakterisiert werden. Für thermische Zersetzungsprozesse typisch wurden im ExpoLab monomodale Partikelgrößenverteilungen beobachtet, die eine relativ schmale geometrische Standardabweichung von knapp 1,7 aufwiesen. Das Aerosol befand sich in einem dynamischen Gleichgewicht, das heißt, dass die mit Nanopartikeln versetzte Luft ständig mit dem gleichen Volumenstrom ins ExpoLab am Boden über Quellauslässe eingeleitet und gleichzeitig die verbrauchte Laborluft über Deckenauslässe abgesaugt wurde. Der Agglomerationsprozess der Nanopartikel bzw. der Aggregate ist sehr schnelllebig und bildet unter konstanten Volumenströmen in der Zu- und Abluft ein Gleichgewicht aus. Innerhalb von Sekunden kann ein Wachstum des mittleren Partikeldurchmessers beobachtet werden, wenn sich die Umgebungsbedingungen von denjenigen des dynamischen Gleichgewichts unterscheiden. In **Bild 14** sind mehrere SMPS-Messkurven zur Charakterisierung einer nano-ZnO-haltigen Atmosphäre im ExpoLab im Rahmen von Vorversuchen dargestellt, die im Abstand von jeweils 5 min aufgenommen wurden. Wäh-

rend sich die Atmosphäre, die nano-ZnO mit einem mittleren Durchmesser von 18,8 nm enthielt, in einem dynamischen Gleichgewicht befand, sind die anderen Kurven entstanden, als der Volumenstrom des ExpoLabs abgestellt wurde. Es ist erkennbar, dass das „eingesperrte“ nano-ZnO-Material durch Agglomerationsprozesse immer weiter anwuchs. Aufgrund dieses Alterungseffekts stieg der Mobilitätsdurchmesser immer weiter an; dementsprechend sank die Partikelanzahl.

Daher ist die Charakterisierung per REM-Aufnahmen der Atmosphären, die luftgetragene Partikel enthalten, nur sinnvoll, wenn die zu untersuchenden Partikel direkt mit einem geeigneten System abgeschieden werden. Dabei sollten die Umgebungsbedingungen identisch mit den Zielbedingungen des beabsichtigten Studiendesigns sein. Wenn die Partikel direkt aus den Verpackungen oder z. B. als kompaktes Material durch vorherige Abscheidung per Thermophorese untersucht werden, lassen sich in der Regel keine Rückschlüsse ziehen, in welcher Form oder Partikelgröße die Materialien in der ExpoLab-Atmosphäre vorliegen und von Probanden in Humanstudien inhaliert werden.

Das FAP-Sammelsystem scheint für derartige Untersuchungen ideal zu sein, vorausgesetzt, es wird die optimale Sammelzeit erreicht. Falls die Sammelzeit zu kurz gewählt wird, sind zu wenige Partikel auf dem Filter. Bei zu langer Sammelzeit ist die Oberfläche mit Partikeln überfrachtet, es sind dann keine einzelnen Partikelansammlungen mehr zu unterscheiden. Im ungünstigsten Fall würde sich ein ähnliches Bild ergeben, wenn das kompakte Material aus der Verpackung untersucht würde. Wie sich bei unseren Untersuchungen gezeigt hat, kann die optimale Sammelzeit im Vorfeld nicht exakt vorausgesagt werden. Offensichtlich spielen viele Faktoren wie Höhe der luftgetragenen Masse, Morphologie der Partikel, Neigung zur Agglomeration usw. eine Rolle. Die Sammelzeiten variierten zwischen 60 und 480 s, was aber überschaubar war, da die Variation lediglich ca. eine Größenordnung umfasste.

Mikroskalige Partikel können nur mit sehr großem Aufwand mit einer Flammenpyrolyse synthetisiert werden. Die typischerweise bei einer Pyrolyse entstehenden Primärpartikel mit einer Größe von ca. 10 nm müssten sich in sehr langen Agglomerationszeiten und dementsprechend sehr großen Volumina zu mikrometergroßen Partikeln zusammenlagern. Außerdem können keine Materialien mit hoher Reinheit im Flammgenerator erzeugt werden, die sich bei hohen Temperaturen zersetzen würden, wie es z. B. bei BaSO_4 der Fall wäre. Aus diesen Gründen haben wir uns bei unseren Humanstudien für den Weg der Suspensionsvernebelung entschieden. Dazu wurde kommerziell erhältliches Produkt (mikro-ZnO und mikro- BaSO_4) in Wasser suspendiert und mithilfe einer Zweistoffdüse vernebelt. Die Wassertröpfchen, die zerstäubungsbedingt einen mittleren Durchmesser von ca. 10 μm aufwiesen und die gewünschten Partikel enthalten, verdunsteten im Klimaanlagekanal vollständig und gaben den gewünschten Stoff frei. Wie aus den Bildern 3 und 6 erkennbar ist, wurden bei

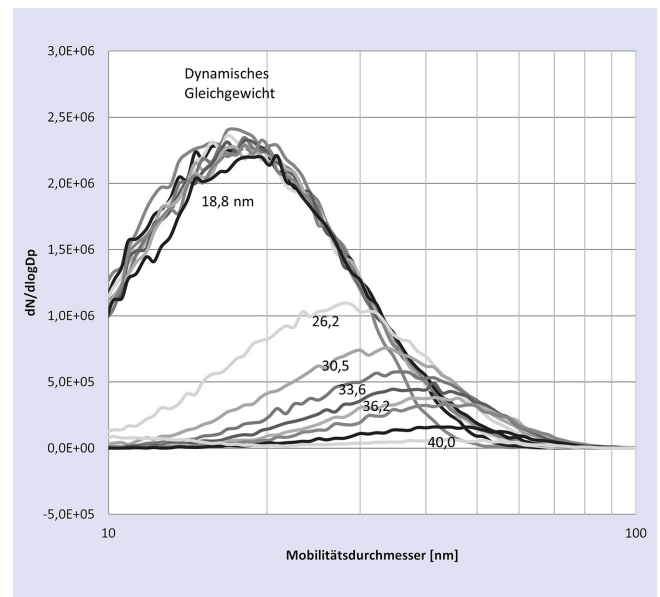


Bild 14 Partikelgrößenverteilung einer ZnO-Atmosphäre im dynamischen Gleichgewicht und anschließender Aerosol-Alterung. Grafik: Autoren

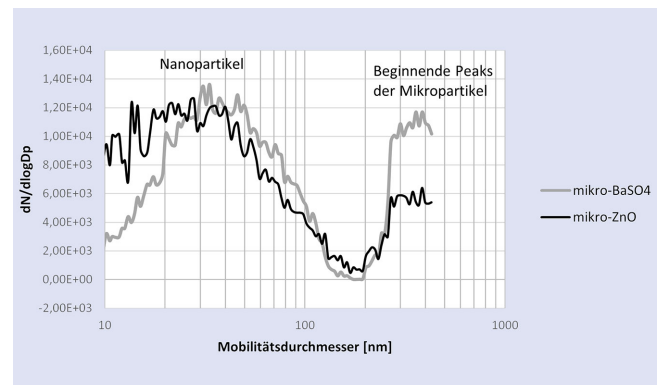


Bild 15 Gemittelte SMPS-Messungen der mikro-ZnO- und mikro- BaSO_4 -Atmosphären im ExpoLab. Grafik: Autoren

den gewählten Versuchsbedingungen keine vereinzelt Einkristalle in den ExpoLab-Atmosphären gefunden, sondern stets verschieden große Ansammlungen von Einzelpartikeln. Denkbar wären zwei verschiedene Entstehungsweisen: Zum einen könnte der Verdunstungseffekt der Wassertröpfchen, die aus der Zweistoffdüse gelangten, die darin enthaltenen Einzelpartikel zusammenballen lassen. Unterschiedlich große Wassertröpfchen würden eine unterschiedliche Anzahl an Einzelpartikeln enthalten, die nach dem Trocknungsvorgang zu den beobachteten Ansammlungen unterschiedlicher Größen führen. Zum anderen könnte die Suspension bereits diese Partikelansammlungen enthalten, die sich dann unverändert im Aerosol wiederfinden. Die Bilder 5 und 8

lassen leider keinerlei Rückschlüsse auf den vorherrschenden Mechanismus zu, die Materialien erscheinen als unendlich große, kompakte Ansammlung einzelner Partikel. Die begleitenden SMPS-Messungen zeigten neben den von APS-Messungen charakterisierten Mikropartikeln zusätzlich eine nicht unerhebliche Anzahl von Nanopartikeln (**Bild 15**) mit einem Mobilitätswert von 42 nm beim mikro-ZnO bzw. 48 nm beim mikro-BaSO₄. Darüber hinaus ist jeweils ein zweiter Peak rechts im Bild zu erkennen. Diese spiegeln den Beginn der mikroskaligen Materialien wider. Aufgrund der Messgrenzen des SMPS-Analysators sind diese Peaks weiter rechts abgeschnitten. Dieses Phänomen der Nanopartikelbildung nach dem Aerosolisierungsprozess deutet darauf hin, dass das Aerosol noch nicht vollständig getrocknet war. Es sind nanoskalige Wassertröpfchen entstanden [5], die aus mikroskaligen Wassertröpfchen hervorgegangen sind, die zuvor keine Partikel der Suspension enthielten. Der Massenanteil dieser Nanopartikel an den Gesamtpartikelkonzentrationen (2,0 mg/m³ bei mikro-ZnO und 4,0 mg/m³ bei mikro-BaSO₄) ist mit wenigen µg/m³ aber vernachlässigbar klein und nicht in der Lage, bei akuten Inhalationsstudien medizinische Effekte zu verfälschen.

Als letzte Substanz in dieser Untersuchungsreihe wurde die Suspensionsvernebelung am Beispiel von nanofinem P25 untersucht – unter Berücksichtigung der Fragestellung, ob mit dieser Methode Atmosphären erzeugt werden können, die nanofine Substanzen enthalten. Hintergrund ist, dass längst nicht alle Nanopartikel per Flammgenerator synthetisiert werden können und die Suspensionsvernebelung eine gute Alternative darzustellen scheint. Wie beim mikro-ZnO und mikro-BaSO₄ sind in Bild 11 und 12 neben kleineren Ansammlungen von P25-Klümpchen aber relativ häufig wesentlich größere, kugelartige Gebilde auszumachen, die aus mehreren 1000 Einzelpartikeln zusammengesetzt sind. Es ist ersichtlich, dass einzelne Nanopartikel von P25 nicht vorgefunden werden können. Die begleitenden SMPS- und APS-Messungen zeigten, dass das gebildete Aerosol eher einen undefinierbaren Zustand in Hinblick auf nano- oder mikrofeine Größenverteilung einnimmt, als eine nanofine Partikelatmosphäre mit monomodaler Größenverteilung mit relativ kleiner geometrischen Standardabweichung, wie es der Fall beim nano-ZnO oder nano-TiO₂ ist. Bei den APS-Messungen war eine sinnvolle Angabe der geometrischen Standardabweichung nicht möglich, und bei den SMPS-Messungen lag diese bei 2,93 und war damit sehr groß.

Analog zum mikro-ZnO und mikro-BaSO₄ könnten die Bildungen der Partikelansammlungen wiederum mit den beiden verschiedenen Mechanismen erklärt werden. Allerdings spricht die meistens kugelartige Gestalt der Partikelansammlungen auf dem Goldfilter dafür, dass der Entstehungsmechanismus des Verdunstungseffekts der Wassertröpfchen korrekt ist. Falls die P25-Suspension bereits diese Partikelansammlungen enthalten würde, dann sollte das gesammelte Aerosol eher zerrissen aussehende, nicht symmetrische Partikelansammlungen enthalten. Auch hier gilt, dass Bild 13 leider keine Hinweise darauf gibt, welcher Mechanismus greift. Das P25 erscheint als unendlich große, kompakte Ansammlung einzelner Partikel. Festzuhalten ist, dass die Methode der Suspensionsvernebelung von nanofinem P25 unge-

eignet ist, eine Atmosphäre mit nanofinem P25 herzustellen. Zusätzlich spricht gegen dieses Verfahren, dass ab P25-Gehalten > 3 mg/m³ die ExpoLab-Luft diesig aussah und demnach eine Lichtbrechung stattfand, die bei nanoskaligen Partikeln eigentlich nicht hätte stattfinden dürfen.

5 Fazit

In diesem Projekt konnten erfolgreich nano-ZnO, mikro-ZnO, mikro-BaSO₄, Nano-TiO₂ und P25-Atmosphären im IPA-EpoLab hergestellt, auf goldbedampfte Filter mit optimalem Belegungsgrad abgeschieden und per REM charakterisiert werden. Begleitende Messungen wie SMPS, APS und TEOM-Messungen bestätigten, dass es kaum Unterschiede zwischen Soll- und Zielkonzentrationen gab und dass die zu erwartenden Partikelgrößenverteilungen auch erreicht wurden. Zusätzlich konnte die Frage beantwortet werden, ob es mit dem Suspensionsvernebler möglich ist, nanofine Atmosphären herzustellen. Am Beispiel des P25 funktionierte es nicht.

Literatur

- [1] *Monsé, C.; Hagemeyer, O.; Raulf, M.; Jettkant, B.; van Kampen, V.; Kendzia, B. et al.*: Concentration-dependent systemic response after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *Part Fibre Toxicol* 15 (2018) Nr. 8.
- [2] *Monsé, C.; Raulf, M.; Hagemeyer, O.; van Kampen, V.; Kendzia, B.; Gering, V. et al.*: Airway inflammation after inhalation of nano-sized zinc oxide particles in human volunteers. *BMC Pulm Med* 19 (2019) Nr. 266.
- [3] *Monsé, C.; Raulf, M.; Jettkant, B.; van Kampen, V.; Kendzia, B.; Schürmeyer, L. et al.*: Health effects after inhalation of micro and nanosized zinc oxide particles in human volunteers. *Arch Tox* 95 (2021), S. 53-65.
- [4] *Monsé, C. Westphal, G. Raulf, M. Jettkant, B. van Kampen, V. Kendzia, B. et al.*: No inflammatory effects after acute inhalation of barium sulfate particles in human volunteers. *BMC Pulm Med* 22 (2022) Nr. 233.
- [5] *Massoudifarid, M.; Piri, A.; Hwang, J.*: Effects of nanosized water droplet generation on number concentration measurement of virus aerosols when using an airblast atomizer. *Sci Rep* 12 (2022) Nr. 6546.

Dr. rer. nat. Christian Monsé,

Prof. Dr. med. Jürgen Bünger,

Prof. Dr. med. Thomas Brüning

Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA), Bochum.

Carsten Möhlmann,

Bianca Gasse,

Dennis Kaiser,

Dr. rer. nat. Markus Mattenklott

Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), St. Augustin.